

УДК 594.3 : 571.27 + 576.895.122

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ФАКТОРОВ ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЙ
У МОЛЛЮСКОВ *PLANORBARIUS CORNEUS*
(GASTROPODA, PULMONATA)
ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ТРЕМАТОДАМИ**

© Е. Е. Прохорова, И. В. Цымбаленко, Г. Л. Атаев

Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена
наб. р. Мойки, 48, Санкт-Петербург,
E-mail: ataev@herzen.spb.ru
Поступила 19.05.2010

Выполнен анализ экспрессии генов, кодирующих факторы защитных реакций гастропод у моллюсков *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) при заражении трематодами. В работе были использованы катушки, зараженные партенитами трематод из семейств Strigeidae, Notocotylidae, Plagiorchiidae и Schistosomatidae. Показано, что уровень экспрессии генов фибриногенподобного белка, С-лектина, кальций-связывающего белка и цистатинподобного белка различны у незараженных и зараженных моллюсков. Также выявлена зависимость интенсивности транскрипции этих генов в гемолимфе и гепатопанкреасе хозяев от их зараженности.

Ключевые слова: защитные реакции, моллюски, партениты трематод, иммунный ответ.

Моллюски являются одним из основных объектов исследований в области сравнительной иммунологии. Их защитные реакции интенсивно изучаются с точки зрения клеточных и гуморальных составляющих (Атаев, Полевщиков, 2004; Атаев и др., 2005). Однако, несмотря на большой фактический материал, механизмы защитных реакций, в частности взаимодействия между собой клеточных и гуморальных компонентов, во многом остаются неясными. Прояснить многие аспекты функционирования защитных систем моллюсков позволяет изучение генетических основ их резистентности к паразитам (Sorensen, Minshella, 2001; Connors, 2003; Прохорова, Атаев, 2008, и др.). Использование современных молекулярно-генетических подходов и методов позволяет выявлять различия в интенсивности экспрессии факторов защитных реакций у зараженных и незараженных моллюсков, а также у особей с разным уровнем резистентности к заражению (Lewis et al., 2001).

Нами были выбраны факторы, для которых показано участие в защитных реакциях пульмонат в ответ на заражение партенитами трематод: фиб-

риногенподобный белок, кальций-связывающий белок, С-лектин, цистатинподобный белок (Adema et al., 1997; Lewis et al., 2001; Lockyer et al., 2004; Guillou et al., 2007).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектами исследования послужили моллюски *Planorbarius corneus* из Ореджского водохранилища (пос. Вырица Ленинградской обл.). Около 20 % из собранных катушек были заражены партенитами трематод *Cotylurus* sp. (сем. Strigeidae), *Notocotylus* sp. (сем. Notocotylidae), *Plagiorchis* sp. (сем. Plagiorchiidae), *Bilharziella polonica* (сем. Schistosomatidae).

Экстракцию тотальной РНК из клеток гемолимфы, гепатопанкреаса и всего тела моллюсков осуществляли с использованием реактива «TRIzol Reagent» (Invitrogen, Великобритания) в соответствии с инструкцией производителя. Чистоту и нативность полученных препаратов РНК проверяли спектрофотометрически (спектрофотометр Spescord-40) и электрофоретически. Препараты РНК ($A_{260/280} = 1.9$), по данным электрофореза в 1%-ном агарозном геле не содержали примесей ДНК и продуктов деградации РНК. Концентрацию РНК выравнивали по содержанию 28S рРНК.

Гель-электрофорез РНК проводили в агарозе типа V на TBE-буфере (рН 8.0), содержащем 0.089 М Tris, 0.089 М борную кислоту и 0.002 М ЭДТА, с 0.5 мкг/мл бромистого этидия по стандартной методике (Sambrook et al., 1989). Приблизительный размер ПЦР-продуктов определяли по соответствию с размерами фрагментов ДНК-маркера («СибЭнзим», Новосибирск).

Обратная транскрипция, сопряженная с полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР). Синтез кДНК в реакции обратной транскрипции проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг тотальной РНК, 200 единиц М-MLV обратной транскриптазы, однократный буфер для обратной транскриптазы, эквимольную смесь четырех dNTP по 500 мкМ каждого, 1 мкМ смеси случайных праймеров и 25 единиц ингибитора РНКаз. Перед добавлением в инкубационную смесь РНК со случайными праймерами (Syntol, Москва) отжигали в течение 5 мин при 70 °С на многоканальном амплификаторе ДНК (Терцик МС-2). Реакцию проводили в течение 1 часа при 37 °С.

ПЦР проводили в 30 мкл смеси, содержащей 1 мкл синтезированной кДНК, 1.5 единицы Taq-полимеразы, однократный ПЦР-буфер для Taq-полимеразы, эквимольную смесь четырех dNTP по 200 мкМ каждого, по 100 пМ каждого из пары специфических праймеров, сверху наслаивали минеральное масло. Праймеры синтезировали в фирме «Syntol» (Москва).

Электрофоретический анализ ПЦР-продуктов проводили в 1.4%-ном агарозном геле, который окрашивали бромистым этидием, с использованием камеры для горизонтального электрофореза или в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), который окрашивали азотнокислым серебром (Sambrook et al., 1989), с использованием камеры для вертикального электрофореза («Хеликон», Москва). Реактивы для проведения ПЦР и ОТ-ПЦР приобретены в фирме «ИнтерЛабСервис» (Москва).

Специфические праймеры, использованные для обнаружения зрелых транскриптов генов β -актина и факторов защитных реакций гастропод у моллюсков *Planorbarius corneus*

Specific primers used for the revealing of mature transcripts of the genes of β -actin and the factors of gastropodes' defense reactions in the snail *Planorbarius corneus*

мРНК	Номер в «GeneBank»*	Нуклеотидные последовательности прямого (F) и обратного (R) праймеров	Расчетная длина продуктов ПЦР, п. п.	t отжига, °C
β -actin	AF329436	F 5' ATTATGAGGTTAGATTTGGCTGGTC 3' R 5' CTGTGATTTCTTTCTGCATTCTGTC 3'	432	59
FREP 7.1	AY028462	F 5' TATAGAGGCTGGCAGGAGTATCGTG 3' R 5' GACATGTGCAGTTTGAAGTAGCGTG 3'	433	63
CLECT	EB 709537	F 5' ACCAATGGAGGAGGCTAC 3' R 5' TCAATGCAATCTTCGTTTC 3'	221	63
CaBP	EB 709539	F 5' CTTGCTATTATTGCTGTTG 3' R 3' AAGAGATGGAAGATGTGTG 3'	308	60
Cyst	EB 709538	F 5' GGATCCCGTCTGTAAC 3' R 5' ACAATGAAAGGCAATGG 3'	597	50.5

Примечание. FREP 7.1 — фибриногенподобный белок; CLECT — С-лектин; CaBP — кальций-связывающий белок; Cyst — цистатинподобный белок. * — номер нуклеотидных последовательностей в базе данных «GeneBank», по которым осуществлялся подбор праймеров.

Для подбора специфических праймеров были использованы нуклеотидные последовательности мРНК, соответствующие факторам защитных реакций пульмонат и представленные в базе данных «GeneBank». Были выбраны факторы, которые по литературным данным, принимают участие в формировании картины защитных реакций при заражении пульмонат партенитами трематод: фибриногенподобный белок, кальций-связывающий белок, С-лектин, цистатинподобный белок (Adema et al., 1997; Lewis et al., 2001; Lockyer et al., 2004; Guillou et al., 2007).

Нуклеотидные последовательности специфических праймеров и условия амплификации подбирали с помощью программы «GeneRunner 3.0» (см. таблицу).

Секвенирование продуктов амплификации осуществляли в фирме ООО «АТГ СервисГен» (Санкт-Петербург).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень экспрессии исследуемых генов факторов защитных реакций у *Planorbarius corneus* оценивали по отношению к активности гена, кодирующего β -актин. Специфические праймеры для кДНК β -актина подбирали, используя последовательности нуклеотидов гена β -актина *Biomphalaria glabrata*. По данным секвенирования, ПЦР-продукт, получаемый с по-

actin P	ATTATGAGGTTAGATTGGCTGGTCGTG---CTCACAGATTACT-GATGAAA-TCCTCACT	57
actin B	ATTATGAGGTTAGATTGGCTGGTCGTGACCTCACAGATTACTTGATGAAAATCCTCACT	1381
actin P	GA-AGAGGTTACAGCTTCACCACAACAGCTGAGCGTGAAATTGTTCCGTGACATCAATGAA	116
actin B	GAGAGGGGATACAGCTTCACCACAACAGCTGAGCGTGAAATTGTTCCGTGACATCAAAGAA	1441
actin P	AA-CTCTGCTATGTGGC-CTAGATTTTGAACAGGAAATGCAACAGCTTCAACCTCTTCA	174
actin B	AAGCTCTGCTATGTGGCTCTAGATTTTGAACAGGAAATGCAACAGCTTCCAGCTCTTCA	1501
actin P	TCCCTTGAGAAGAGCTACGAACCTCCCTGACGGTCAGGTCATTACCATCGGCAATGAGCGT	234
actin B	TCTCTTGAGAAGAGTTATGAGCTTCCTGACGGTCAAGTCATCACCATTGGCAATGAGCGA	1561
actin P	ATAGAATG--CAGAAGCTATGTATCCCAACCATCCCTTTCTTGTGTATGTGAATCTGCAGG	292
actin B	TTCCATGTCCAGAAGCTAAGT-TCCAGCCATC-TTTCCTTG-GTATG-GAAGCTGCTGG	1637
actin P	CATCCAAGAGAACTACCTACAACTCCATCACTGAAGTGCTGATGTTGACACTTGTGTAAA	352
actin B	TATCCATGA-AACAACCTACAACTCCATCA-TGAAATG-TGATGTTGACA-TTG-GTAAA	1692
actin P	GACTTGATGACCAACACTGTATTGTCTGCTGCTCCACCATGTACCCAGCATCGCCATT	412
actin B	GACTTGATG-CTAACACTGTATTGTCTGGTGGTTCCACCATGTTCAG-----GCATT	1746
actin P	GCTCGACAGAAATGCAACGACATCGAACAT	442
actin B	GCA-GACAGAAATGCA-GAAGAAATCAGAG	1774

Рис. 1. Последовательности нуклеотидов кДНК *Biomphalaria glabrata* (actin B) и *Planorbarius corneus* (actin P), соответствующие β-актину.

Здесь и далее в рис. 2—4 выделены гомологичные участки.

Fig. 1. cDNA sequences of *Biomphalaria glabrata* (actin B) and *Planorbarius corneus* (actin P) corresponding to β-actin (here and in fig. 2—4, homologous sequences are marked).

мощью специфических для гена β-актина праймеров, на кДНК *Planorbarius corneus* имеет длину 442 п. н. Его нуклеотидная последовательность на 90 % совпадает с последовательностью мРНК биомфаларии, по которой проводился подбор праймеров (рис. 1).

Фибриногенподобные белки (FREP) являются лектинами и участвуют в связывании и нейтрализации паразитов (Connors, 2003). В настоящее время описано около 10 FREP гастропод. В базе данных «GeneBank» представлены несколько десятков нуклеотидных последовательностей, кодирующих различные домены FREP. Самая полная из них — последовательность гена FREP *Biomphalaria glabrata*, содержащая 16 054 п. н. (AY028462). Наиболее консервативный участок гена, кодирующего FREP — регион, соответствующий фибриногеновому домену. Например, нуклеотидная последовательность, кодирующая фибриногеновый домен FREP 7.1 *B. glabrata*, на 76—94 % совпадает с нуклеотидными последовательностями фибриногеновых доменов других FREP этого вида. Она также гомологична генам FREP у других видов биомфаларий: на 76—91 % — *B. pfeifferi*, на 73 % — *B. alexandrina*, на 67 % — *B. kuhniana*. Совпадение с гомологичными последовательностями FREP *Bulinus africanus* составляет 76—82 %, *B. truncatus* — 68—74 %, *Helisoma duryi* — 75—80 %. В свою очередь разные семейства FREP различаются по структуре более вариабельного иммуноглобулинподобного домена (Zhang, Loker, 2004). Поэтому именно нуклеотидная последовательность гена фибриногенового домена FREP 7.1. *Biomphalaria glabrata* была использована при подборе специ-

FREP P	TATAGAGTCTCGAGGAGTATCGTGACTCATATATATAGAAGAGAGGAAGNGAAGCAGAAG	61
FREP B	-----	
FREP P	AATACAGGGAAATGATGATAACCACTCATGAGCCTCGTCAATGGAAGGTAGATTTCCT	121
FREP B	-----GTCAATGGAAGGTAGATTTCCT--	15205
FREP P	GACATGATGGCTGGCGAAGTGGTATCGTGAGGGCTTTGGAGATTACAACATGACAGGATG	181
FREP B	---ATAGAGGCTGGC--AGGAGTATCGTGACGGCTTTGGAGATTACAACAT-----TG	15253
FREP P	GTGAATTTTATCTGGGGAACGAAAATATATTTAATATTAACCTCAACGGGAAAATATAAT	241
FREP B	GTGAATTTTATCTGGGGAACGAAAATATATTTAA-ATTAACTTCACGGGAAAATATAAT	15312
FREP P	TTAAGAGAAATAGATTGGGAGACGTCCAAGCTCAACCGTATTATGCGCAATATTCGATTTT	301
FREP B	TTAAG-AAATAGATTGGTT---TTAAAAATCAACCGTATTATGCGCAATATTCGATTTT	15369
FREP P	CTAAATTTTAAAGTGATTTTACCATTACAGATAAAATATGGGAGGCTATTCTGCATATGC	361
FREP B	TCAAATTTTAAAGTGAAAAAACCATTACAGATAAAATGTGGGAGGCTATTCTGAAAATGC	15429
FREP P	CGGTAAACAGGCTCTCGTATCATAATCATATGTCTTTGATACGTTTGATTTGTATAATAA	421
FREP B	CGGTAAACAGGCTCTCGTATCATAATCATATGTACTTTAGTACGTTTGATAATGATAATCA	15489
FREP P	TTGATATTCAAGGCGTCAACTGTGCAATTAAATACCAAGGAGCCTGGTGGTACTATACTTG	481
FREP B	TGCATATTCAAGGCGTCAACTGTGCAGTAAATACCAAGGAGCCTGGTGGTACAAAACCTG	15549
FREP P	TTACGAGTCAAAACATGACGGTAAATGGCTAAGTTCCGATTGAGATTT---AATTGAACATG	539
FREP B	TTACGAGTCAAAACATGAACGGTAAATGGGCAAGTTCCGAAAGAGATAAGGACCTGAACATG	15609
FREP P	GAACACGCTACTTCAAACATGCACATGTC	567
FREP B	GAACACGCTACTTCAAACATGCACATGTC	15637

Рис. 2. Последовательности нуклеотидов кДНК *Biomphalaria glabrata* (FREP B) и *Planorbarius corneus* (FREP P), соответствующие фибриногенподобному белку.

Fig. 2. cDNA sequences of *Biomphalaria glabrata* (FREP B) and *Planorbarius corneus* (FREP P) corresponding to fibrinogen-related protein.

CLECT P	ACCAATGGAGGAGGCTACCCGGCAGAGATTGATGCAGTGTGAGGGCGTGGGGGTTTCGCC	61
CLECT B	ACCAATGGAGGAGGCTACCCGGCAGAGATTGAT--AGTGTGAGGAAATGGGGGTT----	84
CLECT P	TTGTAAAATTTGGTCCGCTCTCGTCTCTGCCCGCCTCGCGCCTCCTGGTCCCGTCGCCG	121
CLECT B	TTGGAAAATTTGGT-----	98
CLECT P	CTGCCCGCTCGNTGACCCCGAAATCGCG-CTGATCTGAGATGTCTTCGTTGTCAGGCTT	181
CLECT B	-----GAA-----AAAT-GTGAATGA-CTGAGA-GTCTTCGTTG-CAGGCTC	137
CLECT P	GGCAGCGCTAAAAGTCA---CACTCGGGGCTTT--GAG--CACAAAGTTAAGATGAGTGTIT	234
CLECT B	--CGACGCCAAAAGTCAACTCACTTGGGTCTTTTCAAGAGAACAACAAGTTAAGATGAGTGTIT	196
CLECT P	TTGATTCTGATCCCTGGCGAACCAGACACAAAGTGGAAACGAAGATTGC--TG-----	287
CLECT B	TTGATTGGATCCCTGGCGAACCAGACACAAAGTGGAAACGAAGATTGCATTGAACATCA	256

Рис. 3. Последовательности нуклеотидов кДНК *Biomphalaria glabrata* (CLECT B) и *Planorbarius corneus* (CLECT P), соответствующие C-лектину.

Fig. 3. cDNA sequences of *Biomphalaria glabrata* (CLECT B) and *Planorbarius corneus* (CLECT P) corresponding to C-lectin.

CaBP P	GTGCTATTATTGTCAGTTGCCACTCATAGCTGCCAGCTCGAGACCAGACCATTACTACT	61
CaBP B	CTTGCTATTATTG-CTGTTGCCATTTTGGCTGGCTGGTTCG-----	93
CaBP P	ACCGCCTATAGAACGATATCCACGACCTCTCCTAAACCCAGCCCGCGGCTCAACAAA	121
CaBP B	-----CCCAGCCCGGGGTCAACAAAAC	117
CaBP P	TGAACAATTTGTTCCAAAG-TATGGTGTGAATGATAAAGTTGCAACCCCTTGCAACAAAAC	180
CaBP B	TCAACAATTTGTTCCAAAGATACGGTGGC-AATGATAAAGTTG-----TTGCAACAAAAC	144
CaBP P	GAGTTAGATAAGCTCTGATCGATCATTCTGAAGACGATGCTCATGTCTAGCACTGTCAAA	240
CaBP B	GAGTTTGCCAGGTTCTGG-CT-TCATTTTGATGACGATGGTGATG----GCAGTGTCA--	196
CaBP P	GCAACATGAGTGTGTTGATACTCGGATCCTAAAGATCAGCAAGGTTCTCACTCATCCAC	300
CaBP B	GCAACCAAGAGT--TTGATAG-CGG-ATGG---AGA-CAGGAAGGTT-TCCCTATCCAC	247
CaBP P	CATATACTGCTCTGCTATTTCCTCGCTAGTTCAGA-GCTGTCCATGACG-AGG--CGCTA	358
CaBP B	AAAACGCTCCTCT-CTATTTCCTCG--AGTT-AGACGCTGTCCATGACG-AGGTTCCTCA	302
	* * * * *	
CaBP P	GTGCTCAAGATTTTCCACACATCTTCCTAACTCAT	393
CaBP B	CT-CTCAAGATTTTCCACACATCTTCCTATCTCT	336

Рис. 4. Последовательности нуклеотидов кДНК *Biomphalaria glabrata* (CaBP B) и *Planorbarius corneus* (CaBP P), соответствующие кальций-связывающему белку.

Fig. 4. cDNA sequences of *Biomphalaria glabrata* (CaBP B) and *Planorbarius corneus* (CaBP P) corresponding calcium-binding protein.

фических праймеров для изучения экспрессии FREP *Planorbarius corneus* (см. таблицу).

Экспрессия гена, кодирующего FREP, выявлена во всех исследуемых образцах РНК. Результаты ОТ-ПЦР анализа показали присутствие во всех образцах фрагмента ДНК, длиной 560—570 п. н. (см. рис. 7). Анализ ПЦР-продукта, полученного со специфическими праймерами на FREP, показал, что его нуклеотидная последовательность (566 п. н.) на 79 % совпадает с последовательностью мРНК биомфалирий, по которой производился подбор праймеров (рис. 2). Это также подтверждает высокую консервативность фибриногенового домена FREP, о которой упоминалось выше.

Установлено, что уровень экспрессии гена FREP повышается у моллюсков, зараженных трематодами *Cotylurus* sp. и *Bilharziella polonica*. Однако он значительно снижается у особей, зараженных *Plagiorchis* sp. и *Notocotylus* sp. (рис. 5).

Согласно литературным данным, на интенсивность экспрессии генов, кодирующих разные группы FREP, влияет как уровень резистентности моллюска, так и срок заражения трематодами. Так, при заражении моллюсков *Biomphalaria glabrata* мирацидиями *Echinostoma paraensei*, у особей и резистентной, и чувствительной линий значительно усиливается транскрипция генов FREP двух подсемейств (FREP 2 и FREP 4). Однако заражение партенитами *Schistosoma mansoni* приводит к усилению экспрессии FREP только у резистентных моллюсков (Hertel et al., 2005). В то же время заражение трематодами *Echinostoma caproni* индуцирует значительное усиление экспрессии генов, кодирующих FREP, у моллюсков чувствитель-

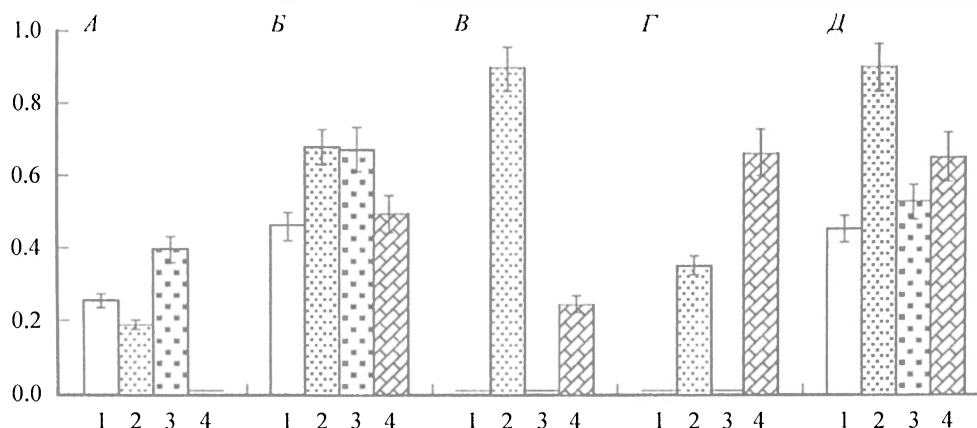


Рис. 5. Экспрессия генов факторов защитных реакций у моллюсков *Planorbarius corneus*, зараженных разными видами трематод.

A — незараженные моллюски; Б–Д — зараженные трематодами моллюски: Б — *Cotylurus* sp., В — *Notocotylus* sp., Г — *Plagiorchis* sp., Д — *Bilharziella polonica*. По оси ординат: уровень экспрессии гена относительно β-актина. По оси абсцисс: 1 — фибриногенподобный белок, 2 — С-лектин, 3 — кальций-связывающий белок, 4 — цистатинподобный белок.

Fig. 5. Expression of genes encoding factors of defense reactions in the snail *Planorbarius corneus* infested with different trematode species.

ной линии (Mitta et al., 2005). При этом после заражения партенитами трематод и у резистентных, и у чувствительных моллюсков уровень экспрессии генов разных FREP изменяется по-разному.

Показаны также конституционные различия в экспрессии FREP у моллюсков резистентных и чувствительных линий (Mitta et al., 2005). Специфическая роль отдельных групп FREP в защитных реакциях гастропод также подтверждается ингибированием их экспрессии после введения моллюскам специфических комплементарных РНК (Jiang et al., 2006).

Для нескольких групп FREP прослежена временная динамика изменения уровня экспрессии соответствующих генов. Показано, что у моллюсков *Biomphalaria glabrata*, зараженных эхиостомы, уровень синтеза мРНК FREP 2 и FREP 4 повышается уже через сутки п. з. При этом интенсивность синтеза мРНК FREP 4 постепенно снижается к 16 дню п. з., а уровень синтеза мРНК FREP 2 остается повышенным и через 21 день п. з. В дальнейшем он не изменяется (Zhang, Loker, 2004).

Лектины С-типа (CLECT) у многих моллюсков принимают участие в распознавании и опсонизации чужеродных объектов (Chai et al., 2008). В базе данных «GeneBank» представлено около 200 различных нуклеотидных последовательностей, относящихся к CLECT моллюсков. Большинство из выявленных последовательностей принадлежит двустворчатым: *Mytilus galloprovincialis*, *M. trossulus*, *M. edulis*, *Chlamys farreri*, *Crassostrea gigas*, *Codakia orbicularis*. Недавно стало известно, что гомолог CLECT есть и у гастропод. При подборе специфических праймеров для выявления последовательностей нуклеотидов, соответствующих этому фактору, мы использовали последовательность ДНК, которая соответствует фрагменту мРНК углевод-связывающего участка CLECT *Biomphalaria glabrata* (EB709537) (см. таблицу).

Специфические праймеры, позволяющие амплифицировать выбранный нами консервативный участок гена CLECT, выявляли продукты разной длины: приблизительно 510 и 287 п. н. (см. рис. 8, А). У большей части моллюсков обнаружен только один из ПЦР-продуктов, и только у небольшой части были выявлены одновременно оба продукта.

Нуклеотидная последовательность ПЦР-продукта, длиной 287 п. н., на 64.7 % совпадает с соответствующей последовательностью мРНК, соответствующей CLECT биомфаларии (рис. 3). При этом полученная кДНК содержит участок, длиной 59 п. н., отсутствующий в мРНК биомфаларии. На оставшемся участке последовательности совпадают на 83 %.

Для определения уровня экспрессии гена CLECT были использованы образцы, в которых представлен продукт длиной 287 п. н.

Установлено, что уровень экспрессии гена CLECT повышается при заражении моллюсков партенитами трематод (см. рис. 5). Так, по сравнению с незараженными катушками, у особей, зараженных *Plagiorchis* sp., он выше в 2 раза, *Cotylurus* sp. — в 3.5 раза, а у зараженных *Notocotylus* sp. и *Bilharziella polonica* — почти в 5 раз.

Ранее было показано повышение уровня экспрессии гена CLECT у моллюсков *Biomphalaria glabrata*, зараженных *Echinostoma caproni* (Guillou et al., 2007). Кроме того, отмечено повышение содержания лектинов С-типа в гемолимфе *Biomphalaria glabrata*, иммунизированных грамположительными бактериями и дрожжами (Guillou et al., 2004; Chai et al., 2008). Таким образом, внедрение чужеродных факторов активизирует гены, кодирующие факторы, принимающие участие в процессах распознавания и клеточной адгезии. Наши результаты согласуются с этим данными и подтверждают роль CLECT в защитных реакциях пульмонат на заражение партенитами трематод.

Группа кальций-связывающих белков (CaBP) принимает участие в регуляции активности и подвижности клеток, вовлеченных в защитные реакции моллюсков (Deininger et al., 2002; Vergote et al., 2005). В настоящее время известны неполные нуклеотидные последовательности мРНК, соответствующие CaBP нескольких видов бивальвий (*Chlamys farreri*, *Crassostrea gigas*, *Argopecten irradians*) и гастропод *Biomphalaria glabrata*. Для подбора праймеров, позволяющих выявлять транскрипты, соответствующие мРНК CaBP у *Planorbarius corneus*, была использована представленная в «GeneBank» последовательность нуклеотидов мРНК CaBP *Biomphalaria glabrata* (EВ709539) (см. таблицу).

С использованием праймеров, специфичных выбранному участку гена CaBP, выявляется 2 продукта длиной около 390 и 590 п. н. (см. рис. 8, Б). У большей части моллюсков обнаружен только продукт длиной 390 п. н. Амплификат длиной 590 п. н. получен на кДНК гемоцитов и гепатопанкреаса незараженных моллюсков и гемоцитов зараженных моллюсков. Анализ амплификата длиной 393 п. н. (размер уточнен в результате секвенирования), полученного со специфическими праймерами для CaBP, показал, что его нуклеотидная последовательность на гомологичном участке на 78.5 % совпадает с последовательностью мРНК биомфаларии, которую использовали при подборе специфических праймеров (рис. 4).

Установлено, что уровень экспрессии гена CaBP у моллюсков, зараженных *Cotylurus* sp. и *Bilharziella polonica*, выше, а *Notocotylus* sp. и *Plagiorchis* sp. — ниже, чем у незараженных (рис. 5).

Литературные данные по экспрессии гена, кодирующего CaBP, противоречивы. Некоторые исследователи отмечают значительное усиление активности транскрипции генов CaBP у зараженных моллюсков резистентных линий (Guillou et al., 2007). Согласно данным других авторов (Vergote et al., 2005), содержание этого белка в плазме гемолимфы и уровень транскрипции его гена гораздо выше у незараженных моллюсков чувствительных линий. Однако после заражения в резистентных особях наблюдается усиление экспрессии гена, в то время как в восприимчивых — ее ослабление.

Цистатинподобные белки (Cyst) гастропод принимают участие во внеклеточных реакциях, обеспечивая регуляцию противоинфекционного ответа и элиминацию паразитов (Mitta et al., 2005). В базе данных «Gene-Bank» представлены нуклеотидные последовательности мРНК Cyst только двух видов моллюсков — *Crassostrea gigas* и *Biomphalaria glabrata*. Для подбора специфических праймеров была использована нуклеотидная последовательность мРНК Cyst *Biomphalaria glabrata*.

С использованием праймеров, соответствующих гену Cyst, на разных кДНК были получены продукты размером около 250, 400, 450 и 700 п. н. (см. рис. 9). У незараженных моллюсков соответствующий Cyst продукт не обнаружен. Таким образом, в условиях нашего эксперимента были выявлены транскрипты гена Cyst только у зараженных трематодами моллюсков. При этом на каждом тотальном препарате РНК идентифицировано не более двух амплификатов. Наличие нескольких ПЦР-продуктов, получаемых на исследуемых матрицах с помощью специфических для гена Cyst праймеров, можно объяснить тем, что подбор праймеров был проведен, исходя из имеющихся в компьютерной базе данных нуклеотидных последовательностей идентичного гена другого вида моллюсков. В то же время именно использование специфических праймеров и специфичность заявленных в базе последовательностей нуклеотидов позволяет с высокой долей идентифицировать указанные ПЦР-продукты, как гомологичные последовательности гена Cyst pulmonat. Мы надеемся, что определение первичной последовательности нуклеотидов, составляющих эти фрагменты ДНК, поможет объяснить наличие всех выявляемых продуктов.

Сравнение уровня экспрессии гена у моллюсков, имеющих продукт одинаковой длины — 400 п. н., показало, что он значительно выше у моллюсков, зараженных паренитами *Plagiorchis* sp. и *Bilharziella polonica*, чем у незараженных особей (рис. 5).

Cyst относится к семейству ингибиторов цистеиновых протеаз, которые представлены в основном однодоменными белками. Они ингибируют цистеиновые протеазы, секретируемые как клетками паразита, так и моллюска, защищая от их разрушительного действия ткани хозяина. В настоящее время показана роль этих белков во внеклеточном противоинфекционном ответе, регуляции эндогенного иммунного ответа. Аналоги Cyst найдены в животных всех типов (Abrahamson et al., 2003). Например, некоторые нематоды секретируют цистатины, ингибирующие иммунные ответы хозяев (Hartmann, Lucius, 2003).

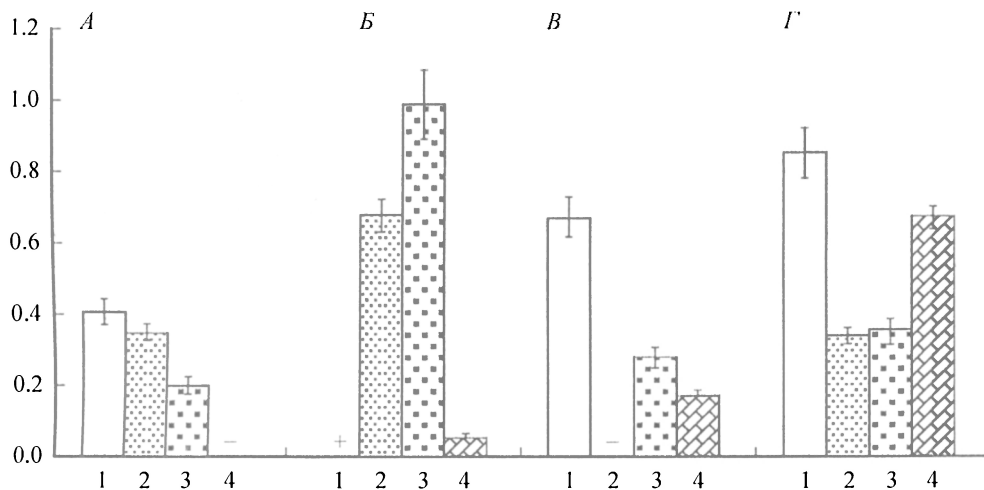


Рис. 6. Экспрессия генов факторов защитных реакций в гепатопанкреасе и гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus*.

A — гемоциты незараженных, B — гемоциты зараженных, B — гепатопанкреас зараженных, Г — гепатопанкреас незараженных. По оси ординат: уровень экспрессии относительно β-актина. По оси абсцисс: 1 — фибриногенподобный белок, 2 — С-лектин, 3 — кальций-связывающий белок, 4 — цистатинподобный белок.

Fig. 6. Expression of the genes encoding factors of defense reactions in the hepatopancreas and hemocytes of the snail *Planorbarius corneus*.

Ранее было показано, что активность транскрипции гена, кодирующего Cyst, при заражении трематодами намного выше у резистентных моллюсков *Biomphalaria glabrata* по сравнению с незараженными особями (Vergote et al., 2005).

Учитывая роль Cyst в ингибировании протеаз паразита, можно предположить, что повышение интенсивности экспрессии Cyst при заражении обеспечивает защиту организма моллюска от последствий воздействия паразита и защитных реакций. У чувствительных особей высокий конститутивный уровень Cyst позволяет смягчать действие проникающего паразита, однако под действием паразита уровень экспрессии снижается.

Таким образом, у моллюсков, зараженных партенитами *Cotylurus* sp. и *Bilharziella polonica*, повышается уровень экспрессии генов всех рассматриваемых факторов, а при заражении *Notocotylus* sp. и *Plagiorchis* sp. — только С-лектина и цистатинподобного белка. Полученные результаты подтверждают видоспецифичность и гуморальных реакций пульмонат.

Результаты молекулярно-генетического анализа также подтверждают роль гемоцитов и клеток гепатопанкреаса в продукции гуморальных факторов защитных реакций. У моллюсков, зараженных партенитами трематод, уровень экспрессии генов, кодирующих CLECT и CaBP, значительно повышается в гемоцитах, а кодирующих FREP и Cyst — в гепатопанкреасе (рис. 6).

У незараженных моллюсков уровень экспрессии гена, кодирующего FREP, выше в гепатопанкреасе, чем в гемоцитах. При заражении он повышается в гепатопанкреасе и резко снижается в гемоцитах. В среднем уро-

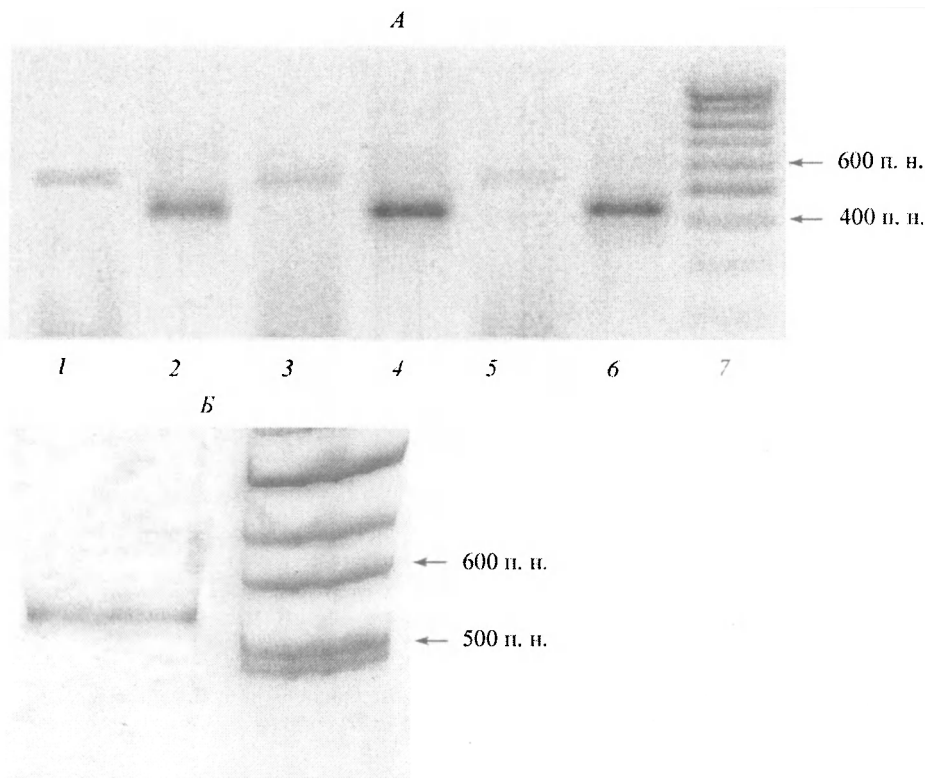


Рис. 7. ПЦР-продукты, получаемые на кДНК *Planorbarius corneus* с помощью специфических праймеров на нуклеотидные последовательности, кодирующие фибриногенподобный белок (FREP) и β -актин у гастропод.

A — электрофорез в 1.4%-ном агарозном геле. 1, 3, 5 — FREP, 2, 4, 6 — β -актин; 1, 2 — заражение *Cotylurus* sp.; 3, 4 — заражение *Bilharziella polonica*; 5, 6 — незараженный моллюск, 7 — ДНК-маркер молекулярных весов 100—1000 п. н. *B* — электрофорез в 8%-ном полиакриламидном геле. 1 — амплификат FREP из гемолимфы зараженных моллюсков, 2 — ДНК-маркер молекулярных весов 100—1000 п. н.

Fig. 7. PCR products obtained on *Planorbarius corneus* cDNA with the specific primers for the sequences encoding fibrinogen-related protein (FREP) and β -actin in gastropodes.

вень экспрессии гена, кодирующего FREP, выше в гепатопанкреасе, чем в гемолимфе.

Считается, что фибриногеновый домен FREP облегчает кальций-зависимое связывание с углеводами, участвуя в процессах распознавания чужеродного и межклеточного взаимодействий (Adema et al., 1999). Резкое снижение экспрессии этого гена в гемолимфе может быть связано с подавлением иммунного ответа моллюска паразитом (Sire et al., 1998). В то же время FREP, вероятно, играют важную роль в формировании капсул вокруг паразитов (Adema et al., 1997), а гепатопанкреас является основным местом паразитирования партенит трематод.

Ген, кодирующий CLECT в гемоцитах, зараженных трематодами *Planorbarius corneus*, экспрессируется значительно интенсивнее, чем у незараженных (рис. 6). Ранее была показана роль CLECT в антимикробном ответе гемоцитов *Biomphalaria glabrata* (Guillou et al., 2007).

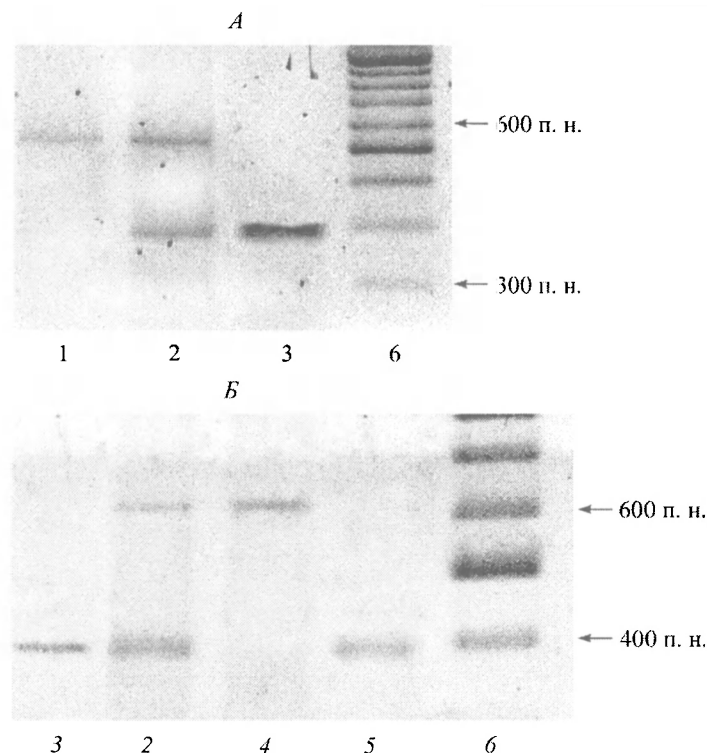


Рис. 8. ПЦР-продукты, получаемые на кДНК *Planorbarius corneus* с помощью специфических праймеров на последовательности, кодирующие С-лектин (А) и кальций-связывающий белок (Б) у гастропод.

Электрофорез в 1.4%-ном агарозном геле. 1 — моллюск, зараженный *Plagiorchis* sp.; 2 — моллюск, зараженный *Bilharziella polonica*; 3 — незараженный моллюск; 4 — гепатопанкреас незараженного моллюска; 5 — моллюск, зараженный *Cotylurus* sp.; 6 — ДНК-маркер молекулярных весов 100—1000 п. н.

Fig. 8. PCR products obtained on *Planorbarius corneus* cDNA with the specific primers for the sequences encoding C-lectin (A) and calcium-binding protein (B) in gastropodes.

В гепатопанкреасе незараженных катушек мы вообще не обнаружили мРНК, соответствующей CLECT, хотя в гепатопанкреасе зараженных ген экспрессируется. Вероятно, именно заражение приводит к «включению» гена. Известно, что лектины С-типа участвуют в распознавании чужеродных объектов, опсонизации и клеточной адгезии. Следовательно, они вовлечены в процессы взаимодействия гемоцитов между собой и с чужеродными объектами (Chai et al., 2008). Наши результаты свидетельствуют о роли не только гемоцитов, но и клеток гепатопанкреаса в продукции CLECT. Возможно, именно гепатопанкреас является основным местом синтеза этого белка в ходе трематодной инвазии.

Уровень экспрессии CaBP у моллюсков *Planorbarius corneus*, зараженных трематодами, повышается в гемоцитах в 5 раз по сравнению с незараженными катушками, в то время как в гепатопанкреасе зараженных катушек он лишь незначительно отличается от такового в гепатопанкреасе незараженных особей (рис. 6).

Согласно литературным данным, CaBP участвуют в регуляции подвижности клеток и процессах распознавания гемоцитами патогена (McGreal et

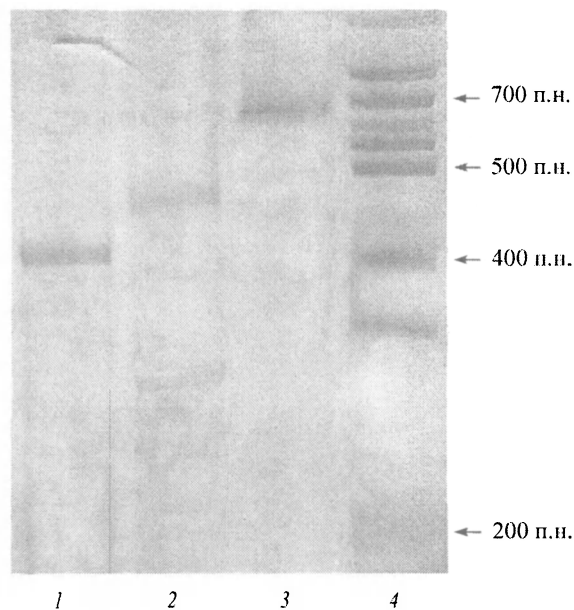


Рис. 9. ПЦР-продукты, получаемые на кДНК *Planorbarius corneus* с помощью специфических праймеров на последовательности, кодирующие цистатинподобный белок.

Электрофорез в 8%-ном полиакриламидном геле. 1 — моллюск, зараженный *Cotylurus* sp.; 2 — моллюск, зараженный *Bilharziella polonica*; 3 — моллюск, зараженный *Plagiorchis* sp.; 4 — ДНК-маркер молекулярных весов 100—1000 п. н.

Fig. 9. PCR products obtained on *Planorbarius corneus* cDNA with the specific primers for the sequences encoding cystatin-like protein in gastropodes.

al., 2004; Santamaria-Kisiel et al., 2006). Аналогами кальций-связывающих белков моллюсков являются аллотрансплантат-ингибирующие факторы млекопитающих и цитокины, вовлеченные в процессы отторжения аллотрансплантатов (Deininger et al., 2002). Показано, что именно обнаруженная у гастропод группа CaBP участвует в антипаразитарном ответе (Vergote et al., 2005).

Гемоциты являются основными эффекторными элементами клеточных реакций пульмонат. И такое резкое повышение интенсивности экспрессии гена CaBP у зараженных трематодами моллюсков подтверждает важную роль CaBP в антипаразитарном ответе. Повышение уровня экспрессии гена именно в гемоцитах также подтверждает предположение о том, что различия в интенсивности и стратегиях иммунного ответа у моллюсков связаны прежде всего с разной способностью гемоцитов к адгезии и распознаванию своего—чужого (Adema et al., 2000; Bouchut et al., 2006).

Ген, кодирующий Cyst, также экспрессируется и в гемоцитах, и в гепатопанкреасе зараженных особей. При этом в гемоцитах незараженных моллюсков соответствующие транскрипты не обнаружены. По нашим данным, уровень экспрессии гена Cyst выше в гепатопанкреасе, чем в гемолимфе зараженных особей (рис. 6). Высокая активность экспрессии гена ранее была отмечена в скоплениях гемоцитов вокруг спорозист (Guillou et al., 2007) и клетках гепатопанкреаса (Guillou et al., 2007).

Таким образом, наши результаты показывают, что и гемоциты, и клетки гепатопанкреаса моллюска *Planorbarius corneus* принимают участие в экс-

прессии рассматриваемых факторов защитных реакций. При этом уровень экспрессии разных факторов различен в гемолимфе и гепатопанкреасе, что, вероятно, указывает на их разную роль в защитных реакциях pulmonat. Кроме того, уровень экспрессии исследованных генов различен у моллюсков, зараженных разными видами трематод, что подтверждает видоспецифичность гуморального ответа pulmonat.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования «Развитие научного потенциала высшей школы» № 2.1.1./5290 и гранта РФФИ № 10-04-00938-а.

Список литературы

- Атаев Г. Л., Еремина Е. Е., Полевщиков А. В. 2005. Защитные реакции брюхоногих моллюсков: 2. Гуморальные реакции. *Паразитология*. 39 (1): 3—15.
- Атаев Г. Л., Полевщиков А. В. 2004. Защитные реакции брюхоногих моллюсков: 1. Клеточные реакции. *Паразитология*. 38 (4): 342—351.
- Прохорова Е. Е., Атаев Г. Л. 2008. Генетические основы резистентности гастропод. *Изв. РГПУ им. А. И. Герцена* 10 (64): 86—96.
- Abrahamson M., Alvarez-Fernandez M., Nathanson C. M. 2003. Cystatins. *Biochemical Society symposium*. 70: 179—199.
- Adema C. M., Hertel L. A., Loker E. S. 1999. Evidence from two planorbid snails of a complex and dedicated response to digenean (echinostome) infection. *Parasitology*. 119: 395—404.
- Adema C. M., Hertel L. A., Miller R. D., Loker E. S. 1997. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 94: 8691—8696.
- Adema C. M., Sapp K. K., Hertel L. A., Loker E. S. 2000. Immunobiology of the relationships of the echinostomes with snail intermediate hosts. In: *Echinostomes as experimental models for biological research*. Dordrecht / Boston / London: Kluwer Academic Publishers. 149—173.
- Bouchut A., Roger E., Coustau C., Gourbal B., Mitta G. 2006. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: Potential involvement of adhesion genes. *Intern. Journ. Parasitol.* 36: 175—184.
- Chai L.-Q., Tian Y.-Y., Yang D.-T., Wang J.-X., Zhao X.-F. 2008. Molecular cloning and characterization of a C-type lectin from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Development. Compar. Immunol.* 32 (1): 71—83.
- Connors V. A. 2003. The schistosome-snail interaction: factors involved in host immunodefense activation and parasite killing in susceptible and resistant *Biomphalaria glabrata*. *Taxonomy, ecology and evolution of metazoan parasites*. 1: 203—224.
- Deininger M. H., Meyermann R., Schluesener H. J. 2002. The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. *FEBS letters*. 514 (2—3): 115—121.
- Guillou F., Mitta G., Dissous C., Pierce R., Coustau C. 2004. Use of individual polymorphism to validate potential functional markers: case of a candidate lectin (BgSel) differentially expressed in susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata*. *Compar. Biochem. Physiol.* 138: 175—181.
- Guillou F., Mitta G., Galiniera R., Coustau C. 2007. Identification and expression of gene transcripts generated during an anti-parasitic response in *Biomphalaria glabrata*. *Development. Compar. Immunol.* 31: 657—671.

- Hartmann S., Lucius R. 2003. Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *Intern. Journ. Parasitol.* 33 (11): 1291—1302.
- Hertel L. A., Adema C. M., Loker E. S. 2005. Differential expression of FREP genes in two strains of *Biomphalaria glabrata* following exposure to the digenetic trematodes *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. *Development. Compar. Immunol.* 29: 295—303.
- Jiang Y., Loker E. S., Zhang S. 2006. M. In vivo and in vitro knockdown of FREP2 gene expression in the snail *Biomphalaria glabrata* using RNA interference. *Development. Compar. Immunol.* 30: 855—866.
- Lewis F. A., Patterson C. N., Knight M., Richards C. S. 2001. The relationship between *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*: genetic and molecular approaches. *Parasitology.* 123: 169—179.
- Lockyer A. E., Noble L R., Rollinson D., Jones C. S. 2004. *Schistosoma mansoni*: resistant specific infection-induced gene expression in *Biomphalaria glabrata* identified by fluorescent-based differential display. *Exper. Parasitol.* 107: 97—104.
- McGreal E. P., Martinez-Pomares L., Gordon S. 2004. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Molec. Immunol.* 41 (11): 1109—1121.
- Mitta G., Galiniera R., Tisseyre P., Allienne J.-F., Girerd-Chambazc Y., Guilloua F., Bouchuta A., Coustau C. 2005. Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Development. Compar. Immunol.* 29: 393—407.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition. Vol. 1—3.
- Santamaria-Kisiel L., Rintala-Dempsey A. C., Shaw G. S. 2006. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem. Journ.* 396 (2): 201—214.
- Sire C., Rognon A., Theron A. 1998. Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect *Biomphalaria glabrata* snails: acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism? *Parasitology.* 117: 117—122.
- Sorensen R. E., Minchella D. J. 2001. Snail-trematode life history interactions: past trends and future directions. *Parasitology.* 123: 3—18.
- Vergote D., Bouchut A., Sautiere P. E., Roger E., Galinier R., Rognon A., Coustau C., Salzert M., Mitta G. 2005. Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. *Intern. Journ. Parasitol.* 35: 215—224.
- Zhang S. M., Loker E. S. 2004. Representation of an immune responsive gene family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Gene.* 341: 255—266.

EXPRESSION OF GENES ENCODING DEFENSE FACTORS IN THE SNAIL PLANORBARIUS CORNEUS (GASTROPODA, PULMONATA) INFESTED WITH TREMATODES

© E. E. Prokhorova, N. V. Tsymbalenko, G. L. Ataev

Key words: defense reactions, snails, Trematoda, parthenites, immune reactions.

SUMMARY

Because many species of gastropods are intermediate hosts for trematodes, these molluscs are often used as model-organisms in the studies of invertebrate immune system. Revealing of the ways in which the defense factors functioning became possible due to the use of the methods of molecular biology. Contemporary molecular methods allow analyzing the defense factors allocations and levels of their expression.

We investigated the expression of genes encoding defense factors in gastropods by the example of the snail *Planorbarius corneus* from water bodies of the Leningrad Oblast under infestation with trematods. The snails naturally infested with the parthenites of trematode species belonging to the families Strigeidae, Notocotylidae, Plagiorchiidae, and Schistosomatida were used as the experimental sample. Uninfested snails were used as a control sample. Several genes encoding the factors, which have been recently found involved in the anti-trematode defense reactions in pulmonates, were chosen, namely fibrinogen-related protein, C-lectin, calcium-binding protein, and cystatin-like protein.

The genes' expression was analyzed on total mRNA samples by the reverse transcription with the polymerase chain reaction. It was shown that expression levels of the genes under consideration are different in uninfested snails and in the snails infested with different trematode species. Thus, in the mollusks infested with the parthenites of *Cotylurus* sp. and *Bilharziella polonica*, the expression levels of the genes of all factors under study were increased, while in the infested *Notocotylus* sp. и *Plagiorchis* sp., only expression levels of C-lectin and cystatin-like protein were increased.

Results of the expression analysis confirm the role of hemocytes and cells of hepatopancreas in the production of humoral defense factors. In the snails infested with trematodes, the expression levels of C-lectin and calcium-binding protein genes are increased in haemocytes, while the genes of fibrinogen-related and cystatin-like proteins are activated in the hepatopancreas. Our data also confirm the role of the factors examined in the anti-trematode defense reactions in pulmonates.